

JP-59-67965 A

(Abstracted content)

This reference relates to an artificial liver device. This artificial liver device has a reactor comprising a column filled up with beads being adhered with hepatocyte.

The beads act as carriers for hepatocyte and comprise a material of dextran, agarose or polystyrene for tissue culture. The size of the beads are for example 150-200 mesh and the beads are coated with a coating agent such as collagen or fibronectin to increase adherence of hepatocyte to the beads.

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭59-67965

⑫ Int. Cl.³

識別記号

序内整理番号

⑬ 公開 昭和59年(1984)4月17日

A 61 M 1/03

1 0 7

6829-4C

発明の数 2

審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑭ 人工肝臓装置

⑮ 特 願 昭57-179297

⑯ 出 願 昭57(1982)10月13日

⑰ 発 明 者 三浦喜温

西宮市甲陽園目神山町1番地の
700

⑱ 発 明 者 岡崎光雄

川西市水明台3丁目5番80号

⑲ 発 明 者 吉良和也

広島県高田郡甲田町下甲1624

湧永製薬株式会社中央研究所内

⑳ 出 願 人 湧永製薬株式会社

大阪市福島区福島三丁目1番39
号

㉑ 代 理 人 弁理士 猪股清 外 2 名

明 細 書

1. 発明の名称 人工肝臓装置

2. 特許請求の範囲

1. 肝細胞を培養させたビーズを充填したカラ
ムからなることを特徴とする、人工肝臓装置用反
応器。

2. ビーズが、^{ラジ}アキストV—ミ系の組織培養用ビ
ーズまたはその誘導物にコラーゲンコーティン
グを施したものである、特許請求の範囲第1項
記載の反応器。

3. 肝細胞を培養させたビーズが、浮遊肝細胞を
ビーズと共に培養ビン中でビンの静置および回
転からなる操作を反覆しながら培養することに
よってつくつたものである、特許請求の範囲第
1～2項のいずれかに記載の反応器。

4. 下記の機器からなることを特徴とする、人工
肝臓装置。

(A) 肝細胞を培養させたビーズを充填したカラ

ムからなる反応器。

(B) 患者からの血液の受入部および給養液血
液の送出部を具えた血液透析器。

(C) 透析液に対する酸素供給器。

(D) 透析器(B)からの透析液を、酸素供給器(C)経
由で反応器(A)へ送つてそこを通過させてから
^{血液}透析器(B)へ戻すための送液機構。

3. 発明の詳細な説明

(1) 発明の背景

技術分野

本発明は、生物学的人工肝臓装置に関する。さ
らに具体的には、本発明は、肝細胞を収容した反
応器およびこの反応器を組み込んだヘリブリアド型
人工肝臓装置に関する。

先行技術

肝臓は重要な臓器であつて、その機能としては
生体内での解毒作用、すなわちアンモニア処理、
薬物代謝および糖合能など、および種々の物質の
合成、たとえばアルブミン、グロブリン、血液成

固因子などの合成、が知られている。

肝臓のこのような機能が低下した場合には、それを補う人工的な装置が必要であり、従つて人工肝臓装置がいろいろと考案されているところである。

人工肝臓装置は、非生物学的なものとも生物学的なものとも大別することができる。しかし非生物学的な人工肝臓装置は、肝機能の一部である解毒作用を代行する程度のものでしか考案されていないのが現状なので、前記の複雑な肝機能をできるだけ代行させるためには生物学的な人工肝臓装置に頼らざるを得ないことになる。

その生物学的な人工肝臓装置の中でも、浮遊肝細胞を利用した装置が注目されている(例えば、特開53-94496号公報、Eiseman, H. et al : Surg. 599, 412 (5), (1977)、Eiseman, B. et al : Surg. General, Obst. 142, 21, (1976)、高橋勉夫：人工臓器 7, (6), 1074, (1978)、同 2, (2), 394, (1978) および同 10 (2), 537, (1978))。これらの装置開発と並行して肝細胞の培養法も考案されてきて、単

肝細胞を培養させたビーズを充填したカラムからなること、を特徴とするものである。

また、本発明による人工肝臓装置は、下記の構造からなること、を特徴とするものである。

- (A) 肝細胞を培養させたビーズを充填したカラムからなる反応器。
- (B) 患者からの血液の受入部および処置後血液の送出部を具えた血管透析器。
- (C) 透析液に対する酸素供給部。
- (D) ^{血液}透析液部からの透析液を、酸素供給部(C)經由で反応器(A)へ送つてそこを通過させてから^{血液}透析部(D)へ戻すための逆送機構。

本発明は、ビーズに肝細胞を接合させてこれをカラムに充填したものが長期にわたつて安定した肝機能を代行する効果があつたという発見に基づくものである。浮遊肝細胞を使用場合には前記のような問題点が避け難かつたことからすれば、この発見は思いがけなかつたことといへ、またビーズに肝細胞を効率よく接合させる方法およびその大量培養法を提供することにあつて、本

特開昭59-67965(2)

発明は、浮遊肝細胞は一般に自己融解が速く死細胞が増加し、分離直後の細胞は細胞異常があるので、肝機能維持が難しいものであり、また大量培養の必要性の問題がある。すなわち前記の従来の培養方法では単層静置培養法は大量培養に適さず、浮遊培養法は肝細胞死滅率が高くて長期間の肝細胞機能維持が困難であり、ビーズ担体による方法はこれら二者の短所を補つてはいるが担体への接着性および培養条件に改善の余地がある、といった難点を指摘することができる。

しかしながら、本来浮遊肝細胞は一般に自己融解が速く死細胞が増加し、分離直後の細胞は細胞異常があるので、肝機能維持が難しいものであり、また大量培養の必要性の問題がある。すなわち前記の従来の培養方法では単層静置培養法は大量培養に適さず、浮遊培養法は肝細胞死滅率が高くて長期間の肝細胞機能維持が困難であり、ビーズ担体による方法はこれら二者の短所を補つてはいるが担体への接着性および培養条件に改善の余地がある、といった難点を指摘することができる。

[1] 発明の概要

本発明は上記の点に解決を与えることを目的とし、ビーズに肝細胞を接合させてこれをカラムに充填したものからなる反応器によつてこの目的を達成しようとするものである。

従つて、本発明による人工肝臓装置用反応器は、

発明は医療領域で有意義な貢献をなすものといえよう。

[2] 発明の具体的な説明

1. 反応器

本発明による反応器は、肝細胞を培養させたビーズを充填したカラムからなるものである。

1) ビーズ

肝細胞の担体となるビーズは、その上に肝細胞の接合が可能な各種の素材からなるものでありうる。

そのような素材の代表例は、組織培養用のデキストラン系のもの、アガロース系、ポリメタクリレート系、その他である。

ビーズの大きさは、所定容積のカラム内で所定量の肝細胞担持のための表面積が得られる限り任意である。一般的に言えば、ビーズの大きさは、60メッシュ(タイラー)透過から200メッシュ不透過程度であることが好ましい。ビーズは、ビーズとして製成されたものであつても、それを磨砕しただけとせば150メッシュ透過/200メッシュ

→ 膜致密性の大きさにしたものでよい。

本発明で使用するのに好ましいビーズは、デkastロン系³⁾の組織培養用のビーズおよびその断砕物(上記程度)である。

このようなビーズは、肝細胞の培養を良好にするため、適当なコーティングを施したものであることが好ましい。コーティング剤としては、コラーゲン、フィブロネクチン、その他があるが、前者が好ましい。従つて、本発明で使用する好ましいビーズは、デkastロン系の組織培養用ビーズまたはその断砕物にコラーゲンコーティングを施したものである。なお、コラーゲンコーティング剤自身は公知である(例えば、*Experimental Cell Research* 94, 70, (1975) 参照)。

肝細胞は、犬、豚、牛、猿人猿あるいはヒトの肝臓由来のものが使用可能であるが、免疫学的等の見地からヒト由来のものが好ましい。

2) 肝細胞の培養

肝細胞の培養は、合目的な任意の方法で行なうことができる。好ましい方法は、芽生肝細胞を、

ビーズと共に培養することからなるものである。

特に好ましい肝細胞培養ビーズの製造法は、芽生肝細胞をビーズと共に培養ビン中でビーズの静置および回転からなる操作を反覆しながら培養することからなるものである。ここで「回転」とは、培養ビンがそのある軸を中心に0.5回転以上動くことを意味する。

3) カラム

上記のようにして肝細胞を培養させたビーズは、好ましくは速激しない非芽生肝細胞を除去してから、また必要に応じて粒状希釈剤(たとえば、肝細胞を培養していないデkastロンビーズその他)と共に、カラムに充填する。

カラムの大きさは、たとえば160 mm 径×500 mm 長さ程度のビーズ床が形成される程度であるのがふつである。ビーズ床のカラム入口側および出口側は、適当なフィルターでビーズの流出を防止するようにすべきであることはいうまでもない。

2. ハイブリッド型人工肝臓装置

1) 構成

本発明によるハイブリッド型人工肝臓装置は、下記の装置からなるものである。

(1) 反応器(A)

反応器(A)は、上記した通りのものである。

(2) 血液透析器(B)

透析器(B)は、透析膜の一方の側に患者からの血液を流し、他方の側に透析液を流して、血液と透析液との間の膜透過性によって毒性物質を除去したり、血液中の不足物質を供給したりすることができる任意の装置でありうる。

このような装置は肝臓疾患のある患者の血液透析に供用されているものであり、その具体的構造は、たとえば、標準平板型、中空糸型等があつて、その詳細は「医学のあゆみ、105巻、第5号、497 (1978)」に記載されている。透析膜の具体例は、たとえば、ポリアクリロニトリル(PAN)膜等である。

(3) 酸素供給器(C)

酸素供給器(C)は、透析液の酸素飽和度をあげて、肝細胞を長期間生存させる目的をもつ装置であつて、基本的には人工肺等に用いられている気液膜、膜間、フィルム型等のガス交換の構造をもつものである。

このような装置の具体例は、たとえば、「人工臓器資料集(ライフサイエンスセンター刊)(1976)、p 371」に記載されている。

(4) 送液機構

送液機構(B)は、上記各機器間を透析液が流通するように連絡する配管およびポンプ機構からなる。

配管は透析液および肝細胞に対して無害な素材からなる被覆面を持つべきであり、具体的には、たとえば、シリコンゴムチューブ、その他がある。

ポンプ機構も透析液および肝細胞に対して無害な素材からなる被覆面を持つべきである。ポンプの送液原理も、透析液または血液の管内輸送に

供用されている任意のものであろう。

ポンプの具体例は、たとえば「人工臓器資料集 成(ライフサイエンスセンター刊)(1976), p165」に記載されている。

(5) 透析液

透析液は人工肝臓装置の部材とはいえないかも知れないが、この装置を作動させるために重要な要素である。

本発明で使用する透析液は、前記した透析器の機能を実現するための組成を持つものであるとともに、肝細胞に対して無害であるうえその生育を維持する組成のものでなければならない。

本発明で使用するのに適した透析液の一例は、無機塩(NaCl、マгнеシウム塩、カルシウム塩、リン酸塩、 NaHCO_3 および KCl 等)やアミノ酸およびビタミン(正常の血液成分と同一濃度のもの)を含有し、血液と等張でかつ pH 7.4 のものである。

2) 機能

第1図は、上記のハイブリッド型人工肝臓装置

の一例についてその機能を示す概略図である。

患者(ヒト)がふつうであるが、肝機能低下なし臓器をおこしている動物を一般に意味するものとする)1からの血液は、管路2から透析装置3に入って、透析される。この装置は透析液出入管4によつて血液供給器5へ送られ、ポンプ6によつて反応器7へ送られる。ポンプの能力は、透析液の反応器通過速度が0.3~0.7ml/分程度、たとえば0.5ml/分前後、となるようなものが適当である。

反応器7を通過した透析液は、透析液流入管8で透析器3に戻る。解着洗滌された血液は、血液流出管9によつて、患者に戻される。

図示の装置は、種々の改良が可能である。たとえば、ポンプ6は、3-5-7-3の閉回路の任意の位置に任意の蒸気を取り出すことができ、機器3、5および7は複数基を直列または並列に設けて能力の増大または補給の容易化を図ることができ、運転自動化のための計装を行なうことができることもいうまでもない。

3. 実験例

1) 培養条件の検討

実験に使用した肝細胞の調製は Berry および Friend のコラゲナーゼ震洗法 (Berry, M.W., Friend, D.S.: J. Cell. Biol. 43, 506, (1969)) に準じて行ない、培地は 10% の DMF 培地 (Dulbecco's Modified Eagles Medium) と 199 培地を 1:1 で用い、これに 10% の割合で胎児牛血清と 10^{-4} M の割合でインシュリンおよび 10^{-5} M の割合でデキサメタゾンを加えて使用した。検討を行なった培養器および培養条件を第1表に示す。なお、ビーズは「タイトテックス」(ファルマシア社)を用いた。ビーズの調整は、ファルマシア・フリン・ケミカルズ・エイ・ビーの「マイクロキャリヤー・セル・カルチャー・テクニカルノート」に準じて行なった。なお、「タイトテックス1」は DEAE デキストランであるといわれているものである。

第1表

培養条件	自作條件 培養器	市販條件 培養器	既報培養 ビン
細胞量	1×10^6 cells/ml		
液量	30 ml	30 ml	10 ml
ビーズ量	1.67 mg/ml 乾重		
速度	③30分静置後、15秒間 40 rpm で攪拌する。この操作を4時間くり返す。	③30分静置後、15秒間 25 rpm で攪拌する。この操作を4時間くり返す。	③30分静置後、42 rpm で連続回転する。③30分静置後、手で素早く半回転する。以後この操作をくり返す。
インシュリン・ブドウ糖	37℃、二酸化炭素5%、空気95%、インキュベーターで培養		

なお、各培養器は、第2図で示されたものである。すなわち、第2図Aに示したものは底から、回転自在に、1.5 cmの位置に培養液培養の操作子が設置されるようにした自作製の培養ビンである。

第2図Bは、培養ビンの中心軸が底と接し、操作子とその効を高めるためにK度操作板を有するもので市販品である。

第2図Cは一般に用いられている細口ビンに培養ビンとして用いたものである。

ビーズに懸着した細胞数の測定は、下記の通りに行なった。すなわち、操作板の場合は操作子を止めてから、また回転培養ビンは壁についているビーズをかき落して静置させてから、下K底入でいるビーズを培養液とともに0.5 ml テンブリングした。試料は自然沈降させ、上清を取ってPBS(+)を0.9 ml 入れた後、ビーズをスライドガラスにせてPBS(+)を滴下し、静置している細胞を極力取り除いて、顕微鏡下(×200)でビーズおよび懸着している細胞をカウントした。ビーズは1試料あたり約50個を数え、平均表面積を

34周昭59-67965(5)
 $1.19 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ として1個のビーズ当りの細胞細胞数を計算し、1 cm^2 当りの細胞細胞数を求めた。この結果を第2表に示した。

第2表

培養条件		数
①	自作の操作板培養ビン	100
	市販の培養ビン	60
②	市販の培養ビン	99
	回転培養ビン	99
③	回転	276

この表に示した数値は①を100としたときの肝細胞の懸着パーセントを示す。この表から培養条件は②の回転ビンによる培養で30分静置後手で半回転行なう方法がよかつた。

なお、30分静置後15~20 rpm で0.5回転以上させても②と同様の結果を得た。

このデータから培養条件②の回転ビンによる培養で30分静置後、手で半回転行なう方法がよ

かつた。なお、30分静置後、15~20 rpm で100~270°回転させても②と同様の結果を得た。

2) ビーズの選択およびコラーゲンコーティング効果の検討

肝細胞の調整は実験1)と同様であつた。培養器としては、120 ml 用の細口ビンを用いた。培養条件は、30分静置後、20 rpm で半回転、肝細胞は 1×10^7 viable cells (平均生存率50.6%)、培養液は10 ml、で行なつた。ビーズとしては、「サイトダックス1」、摩擦した「サイトダックス1」および「バイオシロン」(ヌク社)を用い、いずれもビーズ表面積が 100 cm^2 になるようにK入れた。

(1) 摩擦した「サイトダックス1」の調整

「サイトダックス1」適量を乳鉢に入れてPBS(-)で調整させ、乳鉢で摩擦し、これを150~200 gの細口ビン(タイラー)K通し、PBS(-)で洗浄後、瓶上K通つたビーズを取り上②(1)培養条件検討の項)の「サイトダックス1」の調整方法K従つた。

(2) バイオシロンの調整

「バイオシロン」(ヌク社)はポリメチレンで、特許表面処理をしたものである。ビーズ1 gは表面積 255 cm^2 で 2×10^5 個、比重は1.05、平均粒子径は $230 \mu\text{m}$ である。本実験では0.392 g、表面積 100 cm^2 を用い、調整は「バイオシロンNo.1」の「カルテブーション・ブリンジブル・アンド・ワーキング・プロセデュア」(ヌク社)K従つた。

(3) コラーゲンのコーティング法

「サイトダックス1」および「バイオシロン」の重量を各々測定してシリコナイズした試管等K入れたものを、また、摩擦した「サイトダックス1」は水で数回洗浄し、シリカゲルの入ったゲル中、減圧下で各々調整させたものをそれぞれビーズとして使用して、下記の方法K従つてコラーゲンコーティングを行なつた。すなわち、ビーズ体積と同量のコラーゲン溶液を入れ、続いてこの溶液の8分の1容のイーデルMEM地培(Minimum Essential Medium)10倍濃度を入れ、液

特開昭59-67965(6)

第3表

処理例 ビーズ	なにもコー ティングを しない	コラーゲン ゲルコー ティング	コラーゲン 乾燥コー ティング
「サイトグ タス1」	100	111	141
摩擦した 「サイトグ タス1」	65	319	203
「バイオシ ロン」	25	60	108

の色が橙色から赤色になるまで0.1規定の水酸化ナトリウムを加えた。その後、37℃で2～3時間放置すると、コラーゲンゲルが生成した。ゲルが形成したのち、試験管を振盪させゲルをこわし、次にPBS(-)を添加してから遠心にかけて(2000 rpm、5分間)上清およびコラーゲンゲルの断片を除去したものを増地で1回洗浄した。

コラーゲン乾燥コーティング法は、下記の通りK行なつた。すなわちシャーレにビーズを入れ、続いてコラーゲン溶液を、「サイトグタス1」の場合はこれが膨潤するまで、「バイオシロン」の場合はその表面が覆れるまで加えてデシケーター中、減圧下、50℃以下で完全に乾燥させた。その後、「PBS(-)」で2回、増地で1回、洗浄した。

培養肝細胞数の測定は「サイトグタス1」Kについては実験(1)と同じ方法で行ない、「バイオシロン」はスシタ社の「バイオシロンK1」、カルテマーション・プリンシプルズ・アンド・ワークン・プロトコル」に従って行なつた。

以上の結果を第3表に示した。

第3表のデータは、培養時間3～5時間について、コラーゲンコーティングをしていない「サイトグタス1」を使用した場合の培養肝細胞数を100として他のビーズの場合の培養肝細胞数を相対値として示したものである。この結果より、摩擦した「サイトグタス1」Kにコラーゲンコーティングをしたビーズが肝細胞を接着させる媒体として好ましいことがわかる。

(1)および(2)の結果より、ビーズとしては摩擦した「サイトグタス1」を用い、培養条件としては30分静置後、15～20 rpmで180°～270°回転操作することで効果よく肝細胞を接着培養することができる。

3) 反応器の安定性

次に上記の方法で作成したカラム反応器の安定性および解吸率を調べた。

第3図に示すような装置を使用した。この装置は、リザーバー1、ポンプ2およびカラム反応器3(内径1.6 cm)を具備している。リザーバーは送気口、試料採取口およびスターターを具備しており、送気口は5% CO₂、50% O₂および45% N₂からなる気体を送り込むためのもので、試料採取口は透析液を採取するためのもので、スターターは線量供給効率を向上させて溶液を均一にするためのものである。なおここで用いた透析液はBME (Basal Medium Eagle) 培養液に10⁻⁴ Mのインスリン、10⁻⁴ Mデキサメタゾン(Dexamethasone)、100 U/ml ベニシリン、100 μg/ml

ストレプトマイシン、0.25 μg/ml フランジソン、および10%牛胎児血清を添加したものであり流速は1分間1 mlとした。

このカラム反応器の安定性を調べるため、培養肝細胞およびビーズ接着肝細胞についてGOT(グルタミン酸・オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)の漏出を調べた。GOTは、一般に肝細胞が損傷を受けたときに細胞内部より漏出する酵素であって、肝細胞の安定性の指標として通常用いられるものである。

なお、「浮遊肝細胞」のGOTは、単離肝細胞を組織培養用プラスチックに入れ、同時に酸素5%および二酸化炭素5%を流しながら、37℃恒温槽で培養培養したもの、培養液を、「ビーズ接着肝細胞」のGOTは上記の装置(第3図)の試料採取口からの透析液を採取後、各々1000 rpmで5分間遠心した際のの上清をそれぞれ試料とし、カーメン(Karmen)法を用いて測定した。その結果を第4図に示した。この図より、浮遊肝細胞のGOTは4時間で全体の20%漏出したのに対して、ビーズ接

特開昭59-67965(7)

鶏肝細胞のGOTは4時間で全体の2多抽出したに過ぎなかつた。この結果より、カラムに於けるヒトミトコンドリア肝細胞は安定であるといえる。

4) カラム反応器の解毒能

反応器の解毒能を調べるため、第3図の採集口より0、12、24、36、48時間目に採集した透析液を(1)と同様に調製し、この溶液に対し最終濃度が0.25 mM になるようにアンモニアを添加し、生成する尿素をジメチルモノオキシム法 (Pearson, W.R.: Biochem. J. 23, 902 (1939)) で測定した。

尿素合成能は肝臓能を代表すべき機能であつて解毒能の指標となるものである。その結果を第5図に示した。

尿素合成能は、合成速度が0～12時間で2.2 μ モル/時、48～60時間で1.3 μ モル/時、と落ちてはきているが、60時間目までは尿素合成能が保持されていた。

以上より、カラム反応器は解毒能を有していて、しかも比較的安定であるということがいえる。

1…浮遊肝細胞

2…ヒトミトコンドリア肝細胞

第5図は、反応器の解毒能を示すグラフである。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、ハイブリッド型人工肝装置の概略を示す概略図である。

- 1…患者
- 2…透析器
- 3…血液供給器
- 4…ポンプ
- 5…反応器

第2図は、実験に使用した装置を示す一部切欠説明図である。

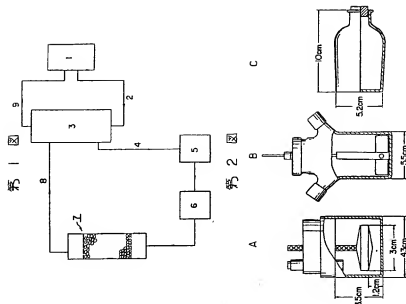
第3図は、カラム反応器の安全性および解毒能を調べるためのモデル系を示す。

- 1…リザーバー (a: 送気口、b: 試料採集口、c: スターラー)
- 2…ポンプ
- 3…カラム反応器

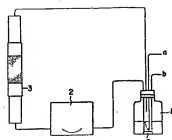
第4図は、反応器の安定性を示すグラフである。縦軸は、反応器から抽出する全体のGOTを100とし、各時間のGOT抽出をパーセントで示したものである。

出願人代理人 橋 坂 清

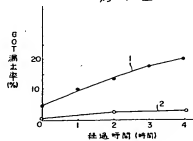
特開昭59-67965(B)



第3図



第4図



第5図

